

Japanese Abstract 4-502408

by: Brian Fish

**TITLE: CHIMERIC IMMUNOGLOBULINS SPECIFIC FOR p55 TAC PROTEIN
OF THE IL-2 RECEPTOR**

ABSTRACT:

The present invention provides novel compositions useful, for example, in the treatment of T-cell mediated human disorders, the compositions containing human-like immunoglobulins specifically capable of blocking the binding of human IL-2 to its receptor and/or capable of binding to the p55 Tac protein on human IL-2 receptors. The immunoglobulins can have two pairs of light chain/heavy chain complexes, typically at least one pair having chains comprising mouse complementarity determining regions functionally joined to human framework region segments. For example, mouse complementarity determining regions, with or without additional naturally-associated mouse amino acid residues, can be used to produce human-like antibodies capable of binding to the human IL-2 receptor at affinity levels stronger than about 10^8 M^{-1} .

The immunoglobulins, including binding fragments and other derivatives, of the present invention may be produced by a variety of recombinant DNA techniques, with ultimate expression in transfected cells, preferably immortalized eukaryotic cells, such as myeloma or hybridoma cells. Polynucleotides comprising a first sequence coding for human-like immunoglobulin framework regions and a second sequence set coding for the desired immunoglobulin complementarity determining regions can be produced synthetically or by combining appropriate cDNA and genomic DNA segments.

The human-like immunoglobulins may be utilized alone in substantially pure form, or complexed with a cytotoxic agent, such as a radionuclide, a ribosomal inhibiting protein or a cytotoxic agent active at cell surfaces. All of these compounds will be particularly useful in treating T-cell mediated disorders. The human-like immunoglobulins or their complexes can be prepared in a pharmaceutically accepted dosage form, which is dependent on the mode of administration.

The present invention also provides novel methods for designing human-like immunoglobulin chains having one or more complementarity determining regions (CDR's) from a donor immunoglobulin and a framework region from a human immunoglobulin, the preferred methods comprising first comparing the framework or variable region amino acid sequence of the donor immunoglobulin to corresponding sequences in a collection of human immunoglobulin chains, and selecting as the human immunoglobulin one of the more homologous sequences from the collection. The human immunoglobulin, or acceptor immunoglobulin, sequence is typically selected from a collection of at least 10 to 20 immunoglobulin chain sequences, and usually will have the highest homology to the donor immunoglobulin sequence of any sequence in the collection. The human immunoglobulin framework sequence will typically have about 65 to 70% homology or more to the donor immunoglobulin framework sequences. The donor immunoglobulin may be either a heavy chain or light

chain (or both), and the humanized light and heavy chain will contain the same kind of chain. A humanized immunoglobulin or antibody, having two light/heavy chain pairs, with or without partial or full-length human constant regions and other proteins.

In another embodiment of the present invention, either in conjunction with the above comparison step or separately, additional amino acids in an acceptor immunoglobulin chain may be replaced with amino acids from the CDR-donor immunoglobulin chain. More specifically, further optional substitutions of a human framework amino acid of the acceptor immunoglobulin relying on a framework amino acid from a donor immunoglobulin will be made at positions in the immunoglobulins where:

- (a) said amino acid in the human framework region of an acceptor immunoglobulin is rare for that position and the corresponding amino acid in the donor immunoglobulin is common for that position in human immunoglobulin sequences; or
- (b) said amino acid is immediately adjacent to one of the CDR's; or
- (c) said amino acid is predicted to be within about 3A of the CDR's in a three-dimensional immunoglobulin model and capable of interacting with the antigen or with the CDRs of the humanized immunoglobulin.

The humanized immunoglobulin chain will typically comprise at least about 3 amino acids from the donor immunoglobulin in addition to the CDR's, usually at least one of which is immediately adjacent to a CDR in the donor immunoglobulin. The heavy and light chains may each be designed by using any one or all three of the position criteria.

When combined into an intact antibody, the humanized light and heavy chains of the present invention will be substantially non-immunogenic in humans and retain substantially the same affinity as the donor immunoglobulin to the antigen (such as a protein or other compound containing an epitope). These affinity levels can vary from about 10^8 M⁻¹ or higher, and may be within about 4 fold of the donor immunoglobulin's original affinity to the antigen.

⑪ 公表特許公報 (A)

平4-502408

⑫ 公表 平成4年(1992)5月7日

⑬ Int. Cl. C 12 P 21/08	案別記号 8214-4B 8717-4B 7236-4B	序内整理番号 C 12 N 15/00 5/00	著者請求未請求 子細審査請求有	部門(区分) A B※
----------------------------	---------------------------------------	--------------------------------	--------------------	-------------------

(全 16 頁)

⑭ 発明の名称 IL-2 レセプターの p55 Tac タンパク質に特異的なキメラ免疫グロブリン

⑮ 特願 平2-503677

⑯ 出願 平1(1989)12月28日

⑰ 暫訳文提出日 平3(1991)5月16

⑱ 国際出願 PCT/US89/05857

⑲ 國際公開番号 WO90/07861

⑳ 國際公開日 平2(1990)7月26日

優先権主張 ② 1988年12月28日 米国(US) ③ 290,975

⑪ 発明者 クイーン, カリー エル. アメリカ合衆国, カリフォルニア 94304, バロ アルト, オークリー クライブ 1300

⑫ 出願人 プロテイン デザイン ラボ アメリカ合衆国, カリフォルニア 94304, バロ アルト, ポータードライブ 3181

⑬ 代理人 弁理士 青木 朗 外3名

⑭ 指定国 AT, AT(広域特許), AU, BB, BE(広域特許), BF(広域特許), BC, BJ(広域特許), BR, CF(広域特許), CC(広域特許), CH, CH(広域特許), CM(広域特許), DE, DE(広域特許), DK, E(広域特許), FI, FR(広域特許), GA(広域特許), GB, GB(広域特許), HU, IT(広域特許), JP, KP, KR, LK, LU, LU(広域特許), MC, MC, ML(広域特許), MR(広域特許), MW, NL, NL(広域特許), NO, RO, SD, SE, SE(広域特許), SN(広域特許), SU, TD(広域特許), TG(広域特許)

最終頁に統く

請求の範囲

1. p55 Tac タンパク質と特異的に反応する実質的に純粋なヒト様免疫グロブリンを含んで成る組成物。
2. 前記免疫グロブリンが2対の重鎖/重鎖二量体を含んで成り、各鎖が可変領域と正常領域を含んで成る、請求項1に記載の組成物。
3. ヒトイントロイキン-2 (IL-2) レセプターへのヒトIL-2 の結合を阻害することができる実質的に純粋なヒト様免疫グロブリンを含んで成る組成物。
4. 前記免疫グロブリンが約 10⁵M⁻¹またはそれより強いヒトイントロイキン-2 (IL-2) への結合親和力を示す、請求項1に記載の組成物。
5. 前記免疫グロブリンが1つの免疫グロブリンからの相補性決定領域および少なくとも1つの異なる免疫グロブリンからのフレームワーク領域を含んで成る、請求項1に記載の組成物。
6. ヒト様フレームワーク領域および天然には該フレームワークと間違がないまたは複数の外來の相補性決定領域を含んで成る組換え免疫グロブリン組成物であって、前記免疫グロブリンがヒトイントロイキン-2 レセプターに結合することができる組成物。
7. 前記免疫グロブリンが IgG₁ 免疫グロブリンイソタイプである、請求項5に記載の組成物。
8. 実験結果および直結可変領域タンパク質配列が図3お

より図4中の疎熱タンパク質配列と実質的に相同である、請求項6に記載の組成物。

9. 2 対の重鎖/重鎖二量体を有し且つ少なくとも約 10⁵M⁻¹の親和力でヒトイントロイキン-2 レセプター上のエピトープと特異的に反応することができるヒト様免疫グロブリンであって、前記重鎖および重鎖が相補性決定領域(CDR)とヒト様フレームワーク領域を含んで成り、ここでCDRが該フレームワーク領域とは異なる免疫グロブリンからのものである、ヒト様免疫グロブリン。

10. ヒトイントロイキン-2 (IL-2) レセプターへのインテロイキン-2 (IL-2) の結合を阻止することができる、請求項9に記載の免疫グロブリン。

11. ヒトイントロイキン-2 レセプターに結合することができるヒト化免疫グロブリンであって、前記免疫グロブリンはヒト様フレームワーク中に抗-Tac 抗体からの I または複数の相補性決定領域(CDR) を含んで成り、ここで前記ヒト様フレームワーク領域は抗-Tac 抗体から選択された少なくとも1つのアミノ酸を含んで成る、ヒト化免疫グロブリン。

12. 図3に示されるような疎熱型組合せ配列、および図4に示されるような疎熱型組合せ配列を有する、請求項11に記載のヒト化免疫グロブリン。

13. 抗-Tac 抗体からの追加のアミノ酸がCDRのすぐ近くに存在する、請求項11に記載のヒト化免疫グロブリン。

14. ヒト患者において丁細胞介在性障害を処置する方法であって、前記患者に治療的有効量の請求項1に記載の免疫グ

特表平4-502408 (2)

レームワークアミノ酸を供与体免疫グロブリンからの対応するアミノ酸で置換する段階を含んで成る方法：

(a) 受容体免疫グロブリンのヒトフレームワーク領域中のアミノ酸がその位置においてまれであり、そして供与体免疫グロブリンの対応するアミノ酸がヒト免疫グロブリン配列中の前記位置において普通である：または

(b) 该アミノ酸がCDRの1つのすぐ近くである：または

(c) 该アミノ酸が三次元免疫グロブリンモデルにおいてCDRの約3Å以内に側鎖原子を有しそして抗原とまたはヒト化免疫グロブリンのCDRと相互作用することができる予想される。

20. 前記ヒト化免疫グロブリン類が、CDRに加えて、選項(a)、(b)または(c)により置換された供与体免疫グロブリンからの少なくとも3アミノ酸を含んで成る、請求項19に記載の方法。

21. 供与体から置換されたアミノ酸のうちの少なくとも1つがCDRのすぐ近くである、請求項20に記載の方法。

22. 請求項18、19または20に從って設計されたヒト化免疫グロブリン。

明細書

I L-2レセプターの p55 Tacタンパク質に特異的なキメラ免疫グロブリン

発明の分野

本発明は一般に、新規治療法を開発するための組換えDNA技術とモノクローナル抗体技術の組合せに關し、更に詳しくは、非免疫性抗体の製造およびそれらの利用に関する。

発明の背景

哺乳類では、外来物質、即ち抗原、と特異的に相互作用する2つのタイプの細胞によって免疫応答が媒介される。これらの細胞タイプの1つであるB細胞は、抗体の生産を担う。第二の細胞クラスであるT細胞は、B細胞とT細胞を含む広範な他の造血細胞の両者の生体内機能を調節する様々な細胞ナップセットを包含する。

T細胞がこの調節に力を及ぼす1つの方法は、最初はT細胞増殖因子と命名されたインターロイキン-2 (IL-2) として知られるリソホカインの生産を通してである。IL-2の主な機能はT細胞の刺激と維持であると思われる。実際、多くの免疫学者はIL-2が全免疫応答の中心にあるだろうと考えている (Farrar, J.ら, *Immunol. Rev.*, 63: 129-166 (1982) 参照、これは参考として本明細書に組み込まれる)。

その生物学的作用を及ぼすために、IL-2は特異的な高

親和性膜レセプターと相互作用する [Greene, W.ら, *Progress in Immunology IV*, E. Brown編, Greene and Statton, New York (1986), 283~頁]。ヒトIL-2レセプターは複数の多量鎖の結合タンパク質であり、1本の鎖は Tacペプチドとして知られ約55kDaのサイズである [Leonard, W.ら, *J. Biol. Chem.*, 260: 1872 (1985) 参照、これは参考として本明細書中に組み込まれる]。このタンパク質をコードする遺伝子が単離されており、そして21アミノ酸のシグナルペプチドを含む272アミノ酸のペプチドを推定している [Leonard, W.ら, *Nature*, 311: 626 (1984) 参照]。p55 Tacタンパク質のN-末端の219アミノ酸は明らかに細胞外領域を含んで成る [Leonard, W.ら, *Science* 230: 633-639 (1984) 参照、これは参考として本明細書に組み込まれる]。

ヒトIL-2レセプターの構造と機能のほとんどは、特異的反応性モノクローナル抗体の開発のためである。特に、抗-Tac として知られるマウスモノクローナル抗体 [Uchizawaら, *J. Immunol.*, 126: 1393 (1981)] は、IL-2レセプターがT細胞上だけでなく、単球-マクロファージ群、肝臓のクッパー細胞、皮膚のランゲルハンス細胞およびもちろん活性化されたT細胞上でも検出され得ることを示した。重要なことには、静止T細胞、B細胞または癌細しているマクロファージは、典型的にはIL-2レセプターを提示しない [Herzenannら, *J. Exp. Med.*, 162: 1111 (1985)]。

抗-Tac モノクローナル抗体は、IL-2相互作用を必要とするリンパ球機能を明らかにするためにも用いられており、

そして細胞培養における細胞毒性およびナブレッサー-アリンバムの発生を含む様々なT細胞機能を抑制することが示されている。また、抗-Tac および他の抗体を用いた研究に基づき、様々な危害、特に浸入T細胞白血病がT細胞による不適当なIL-2レセプター発現に因縁づけられている。

より最近になって、IL-2レセプターはT細胞介在症に対する新規治療アプローチの理想的な薬であることが示された。IL-2レセプター特異的抗体、例えば抗-Tacモノクローナル抗体を単独または免疫複合体（例えばリシンA組、同位体等との免疫複合体）として用いて、IL-2レセプターを有する細胞を効果的に除去できることが提唱されている。例えばそれらの要約は、理論上はIL-2レセプターを発現している白血病細胞、或る種のB細胞、または疾患状態に間与する活性化されたT細胞を標的することができ、その上さらに必要とされる時には或然正常T細胞およびそれらの前駆体の保持によって正常T細胞免疫応答を開始する能力を保有する。一般に、他のT細胞特異的薬剤の多くは本質的に全ての周辺のT細胞を破壊し得、このことは薬剤の治療効能を制限する。全体に、IL-2レセプターに特異的な適当なモノクローナル抗体の使用は、自己免疫疾患、器官移植および活性化されたT細胞による任意の望ましくない応答において選択性の効用を有することができる。実験、例えば抗-Tac抗体を使って臨床試験が開始されている（一般に、Waldmann, T. ら、Cancer Res. 45: 625 (1985) および Waldmann, T., Science 232: 727-732 (1986) を参照のこと；これらは参考

として本明細書中に組み込まれる）。

不適にも、抗-Tac および他の非ヒトモノクローナル抗体の使用は、特に下記に説明されるような取り返し治療患者において、幾つかの欠点を有する。例えば、マウスモノクローナル抗体はヒト抗体を十分に結合せず、そしてヒトにおいて使用すると他の重要な免疫グロブリン機能特性を失く。

おそらくより重要なのは、抗-Tac および他の非ヒトモノクローナル抗体が、ヒト患者に注入すると免疫原となるであろう実質的反応のアミノ酸配列を含むことである。外来抗体の注入後、抗体に対して患者により惹起された免疫応答が非常に強力であり、最初の処置後の抗体の治療効用を本質的に損失しうることを多数の研究が示している。更に、様々な病気を処置するために増加する数の異なるマウスまたは他の抗原性（ヒトに対して）モノクローナル抗体が開発されるとが期待され得るので、任意の異なる非ヒトモノクローナル抗体での第一または第二の処置後、無関係の治療のためさえもその後の処置が無効または危険になり得る。

いわゆる「キメラ抗体」（例えば、ヒト定常領域に連結されたマウス可変領域）は幾らか好結果であることが判明したが、重要な免疫原性の問題が残っている。一般に、多数のヒト抗原と同じく、ヒトIL-2レセプターと反応するヒト免疫グロブリンの生産は、典型的なヒトモノクローナル抗体生産技術を使うことは非常に困難である。同時に、いわゆる「ヒト化された」抗体（例えば EPO 公報 No 0239400 を参照のこと）を作製するために組換えDNA技術を使用すること

は、一部は予想不可能な場合を除いたためである不確かな結果を提供する。

従って、ヒトにおいて実質的に非免疫原性であり、さらに治療製剤および他の用途に適当である形態において容易に且つ経済的に生産される改良形のヒト種免疫グロブリン、例えばヒトIL-2レセプターに特異的なもの、に対する要求が存在する。本発明はそれらおよび他の要求を満たす。

発明の要約

本発明は、例えばT細胞により媒介されるヒト障害の処置において有用である新規組成物を提供し、該組成物は、IL-2レセプターへのヒトIL-2の結合を特異的に阻止することができて/またはヒトIL-2レセプター上のpSS Tacタンパク質に結合することができるヒト種免疫グロブリンを含有する。該免疫グロブリンは、2対の軽鎖/重鎖複合体を有し、典型的には少なくとも1対がヒトフレームワーク領域セグメントに複数個に連結されたマウス相補性決定領域を含んで成る組成を有する。例えば、追加の天然白采のマウスアミノ酸残基を有するかまたは有しないマウス相補性決定領域を用いて、約10⁴M⁻¹よりも強力な親和力レベルにおいてヒトIL-2レセプターに結合することができるヒト種抗体を生産することができる。

結合性断片または他の诱導体を包含する免疫グロブリンは、様々な組換えDNA技術により、トランスフェクトされた細胞、好ましくは不活性化された真核細胞、例えばミエローマエ

細胞ハイブリドーマ細胞中の最大発現を使って生産することができる。ヒト種免疫グロブリンフレームワーク領域をコードする第一の配列と所望の免疫グロブリン相補性決定領域をコードする第二の配列を含んで成るポリスクリオチドは、合成的にまたは適当なcDNAとゲノムDNAセグメントを結合することによって作製することができる。

ヒト種免疫グロブリンは、実質的に純粋な形態で単独に、または細胞毒性物質、例えば放射性核種、リボソーム阻害タンパク質もしくは細胞表面において活性な細胞毒性物質と複合化して、使用することができる。それらの化合物は全て、特にT細胞により媒介される障害を処置することにおいて有用であろう。ヒト種免疫グロブリンまたはそれらの複合体は、投与の形式に依存するであろう医薬上許容される用量において調製することができる。

本発明は、供与体免疫グロブリンからの1または複数の相補性決定領域(CDR) およびヒト免疫グロブリンからのフレームワーク領域を有するヒト種免疫グロブリン鎖を設計するための新規方法も提供する。好ましい方法は、供与体免疫グロブリンのフレームワークまたは可変領域のアミノ酸配列をヒト免疫グロブリン鎖のコレクション中の対応する配列と比較し、そして該コレクションからより相合性の高い配列の1つをヒト免疫グロブリンとして選択することを含んで成る。ヒト免疫グロブリンまたは受容体免疫グロブリン配列は、典型的には少なくとも10-20の免疫グロブリン鎖配列のコレクションから選択され、そして通常は該コレクション中のいずれ

かの配列の供与体免疫グロブリン配列に最も高い相同意を有するだろう。ヒト免疫グロブリンフレームワーク配列は、供与体免疫グロブリンフレームワーク配列に対して典型的には約65~70%またはそれ以上の相同意を有するだろう。供与体免疫グロブリンは重鎖または軽鎖（または両方）のいずれであってもよく、そしてヒトコレクションは同じ種類の鎖を共有するだろう。ヒト化された軽鎖または重鎖を用いて、部分または全長のヒト定常領域および別のタンパク質を含むかまたは含まない、2対の軽鎖/重鎖を有する完全なヒト化免疫グロブリンまたは抗体を形成せしめることができる。

本発明の別の型様によれば、上記の比較段階と共にまた別々に、受容体免疫グロブリン中の追加のアミノ酸をCDR-供与体免疫グロブリン組からのアミノ酸と置き換えることができる。更に特定的には、供与体免疫グロブリンからのフレームワークアミノ酸による受容体免疫グロブリンのヒトフレームワークアミノ酸の異なる位置の置換は、次のような免疫グロブリン中の位置において行うことができる：

(a) 受容体免疫グロブリンのヒトフレームワーク領域中の該アミノ酸がその位置に吊り下りてあり、そして供与体免疫グロブリン中の対応するアミノ酸がヒト免疫グロブリン中のその位置に吊り下りてある；

(b) 該アミノ酸がCDRの1つのすぐ近くである；または

(c) 該アミノ酸が三次元免疫グロブリンモデルにおいてCDRの約3Å以内にあり、そしてヒト化免疫グロブリンの

CDRまたは抗原と相互作用することができると予想される。

ヒト化免疫グロブリン組は、典型的には、CDRに加えて供与体免疫グロブリンからの少なくとも約3アミノ酸を含んでおり、通常は少なくともその1つが供与体免疫グロブリン中のCDRのすぐ近くであろう。3つの位置基準のうちのいずれか1つまたは全部を使うことにより重鎖および軽鎖を各々設計することができる。

完全な抗体に結合される時、本発明のヒト化された軽鎖および重鎖はヒトにおいて実質的に非免疫原性であり、そして供与体免疫グロブリンと実質的に同じ抗原（例えばエビトープを含むタンパク質または他の化合物）への親和力を保持しているだろう。それらの親和力レベルは約 $10^6 M^{-1}$ 以上から様々に異なることができ、そして抗原への供与体免疫グロブリンのものとの親和力の約4倍以内であろう。

図面の簡単な説明

図1：抗-Tac 重鎖（上行）およびE₄重鎖（下行）の配列の比較。アミノ酸の1文字記号が用いられている。各行の最初のアミノ酸に左側に番号を付けてある。2つの配列中の同じアミノ酸は斜線でつながれている。3つのCDRには下線が付してある。ヒド化抗-Tac 重鎖においてE₄アミノ酸よりもむしろ抗-Tac アミノ酸が使用された他のアミノ酸位置は★で示されている。

図2：抗-Tac 軽鎖（上行）およびE₄軽鎖（下行）の配列の比較。アミノ酸の1文字記号が用いられている。各行の

最初のアミノ酸に左側に番号を付けてある。2つの配列中の同じアミノ酸は斜線でつながれている。3つのCDRには下線が付してある。ヒト化抗-Tac 重鎖においてE₄アミノ酸よりもむしろ抗-Tac アミノ酸が使用された他のアミノ酸位置は★で示されている。

図3：ヒト化抗-Tac 重鎖可変領域遺伝子のスクレオチド配列。タンパク質をコードする遺伝子の部分についての翻訳アミノ酸配列がスクレオチド配列の下に示されている。該遺伝子の始まりと共にそのスクレオチドTCTAGAHはIba1部位である。成熟重鎖配列はアミノ酸20のQで始まる。

図4：ヒト化抗-Tac 軽鎖可変領域遺伝子のスクレオチド配列。タンパク質をコードする遺伝子の部分についての翻訳アミノ酸配列がスクレオチド配列の下に示されている。該遺伝子の始まりと共にそのスクレオチドTCTAGAHはIba1部位である。成熟重鎖配列はアミノ酸21のDで始まる。

図5：A. ヒト化抗-Tac 軽鎖遺伝子を合成するために用いた、5'から3'方向に記載した4つのオリゴスクレオチドの配列。B. 前記オリゴスクレオチドの相対位置。矢印は各オリゴスクレオチドの3'方向を指している。

図6：(A) ヒト化抗-Tac 軽鎖遺伝子を合成するために用いた、5'から3'方向に記載した4つのオリゴスクレオチドの配列。(B) 前記オリゴスクレオチドの相対位置。矢印は各オリゴスクレオチドの3'方向を指している。JF02とJF03とのオーバーラップ中のBind部位の位置が示されている。

図7：ヒト化抗-Tac 重鎖を発現させるのに用いるプラスミドpHultAC1の略図。関係する制限部位が示されており、そして重鎖のコード領域が斜線として表示されている。免疫グロブリン(Ig)プロモーターからの転写方向が矢印により示されている。E_c=重鎖ニンハンマー、Hyg=ヒグロマイシン耐性遺伝子。

図8：ヒト化抗-Tac 軽鎖を発現させるのに用いるプラスミドpHultACの略図。関係する制限部位が示されており、そして軽鎖のコード領域が斜線として表示されている。Igプロモーターからの転写方向が矢印により示されている。

図9：抗-Tac 抗体またはヒト化抗-Tac 抗体に次いで標識としてフルオレセイン接合ナギ抗体⁺抗ラットIgG抗体またはナギ抗ヒトIgG抗体でそれぞれ染色されたHut-102およびJurkat細胞のフルオロサイトメトリー。各パネルにおいて、点綴曲線は第一抗体が削除された時の結果を示し、実線曲線は記載された第一および第二（結合）抗体を含む時の結果を示す。

図10：(A) 指示されるような0~40nmの抗-Tac、次いでビオチン化抗-Tac、次にフィコニトリリン接合アビジンで染色されたHut-102細胞のフルオロサイトメトリー。

(B) 指示の抗体、次いでビオチン化抗-Tac、次にフィコエリトリリン接合アビジンで染色されたHut-102細胞のフルオロサイトメトリー。

発明の詳細な記述

本発明の一実施によれば、所望のエピトープ、例えばヒトT細胞上のIL-2レセプター上のエピトープ、と特異的に反応するヒト種免疫グロブリンが提供される。それらの免疫グロブリンは、少なくとも約 $10^4 M^{-1}$ 、好みしくは $10^5 M^{-1}$ ～ $10^{10} M^{-1}$ またはそれ以上の結合親和力を有し、例えばヒトIL-2レセプターへのIL-2の結合を阻止することができる。ヒト種免疫グロブリンは、ヒト種フレームワークを有し、そしてp55 Tacタンパク質上のニビトープと特異的に反応する免疫グロブリン、典型的にはマウス免疫グロブリンからの相補性決定領域(CDR)を有することができる。本発明の免疫グロブリンは、基質的に大量に生産することができ、例えば、種々の技術によるヒト細胞におけるアミノ酸交換の処置において、用途を見出す。

基本的な抗体構造単位は4量体を含むことが知られている。各4量体は全く同じ2対のポリペプチド鎖から成り、各対は1本の「軸」(約25kD)鎖と1本の「翼」(約50-70kD)鎖を有する。各鎖のNH₂-末端は、主に抗原認識を担う約100～110またはそれ以上のアミノ酸の可変領域で始まる。各鎖のCOOH-末端は、主にエフェクター機能を担う定常領域を規定する。

軸鎖はαまたはβのいずれかとして分類される。翼鎖はγ、μ、δ、εまたはτとして分類(および三分類)され、そしてそれぞれIgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEとして抗体のインタイプを規定する。軸鎖および翼鎖中の可変および定常領域

は、約12またはそれより多數のアミノ酸の「J」領域により連結され、翼鎖は約12またはそれより多數のアミノ酸の「D」領域も含む【一般に、Fundamental Immunology, Paul W. E. 第7版、第131-166頁、Raven Press, N.Y. (1984) を参照のこと: これは参考として本明細書中に組み込まれる】。

各種鎖/翼鎖対の可変領域は抗原結合部位を形成する。総て3つの超可変領域によって結合された比較的保存されたフレームワーク領域という同じ一般構造を示す('Sequences of Proteins of Immunological Interest', Kabat, E. ら、U.S. Department of Health and Human Services, (1983); 並びにChalhoubおよびLesk, J. Mol. Biol., 196: 901-917 (1987)を参照のこと。これらは参考として本明細書中に組み込まれる】。各対の二本鎖からのCDRは、フレームワーク領域によって並列され、特異的エピトープへの結合を可能にする。

本明細書中で使用する「免疫グロブリン」なる用語は、免疫グロブリン遺伝子により実質的にコードされるまたは複数のポリペプチドから成るタンパク質について呼称する。認識される免疫グロブリン遺伝子としては、ε、λ、α、τ、δ、εおよびμ定常領域遺伝子、並びに複数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が挙げられる。免疫グロブリンは抗体の他に様々な形態で存在することができ、例えば、Fr. Fab およびFab(ab), 並びに一本鎖を包含する(例えば、Hestonら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85: 5879-5883 (1988)およびBirdら、Science, 242: 423-426 (1988)。これらは参考として本明

細書中に組み込まれる】。【一般に、Kabatら、「Immunology」, Benjamin, N.Y., 第2版(1984); 並びにHuakapillerおよびHood, Nature, 323: 15-16 (1986)を参照のこと。これらは参考として本明細書中に組み込まれる。】

キメラ抗体は、典型的には遺伝子操作によって軽鎖および重鎖遺伝子が異なる組み合いで免疫グロブリン遺伝子セグメントから作製されている抗体である。例えば、マウスモノクローナル抗体由来の遺伝子の可変(V)セグメントをヒト定常(C)セグメント、例えばτ、αおよびγに結合することができる。典型的な型有用キメラ抗体はマウス抗体からのVまたは抗原結合領域とヒト抗体からのCまたはエフェクターフィールドとから成るハイブリッドタンパク質である(例えば、A.T.C.C. 登録番号CRL 9688は抗-Tac キメラ抗体を分泌する)が、他の哺乳動物を用いることもできる。

本明細書中で使用する「フレームワーク領域」なる用語は、Kabatら、前掲により定義されたように、單一鎖において異なる免疫グロブリン間で比較的保存される免疫グロブリン軸鎖および翼鎖可変領域の部分について呼称する。本明細書中で使用する「ヒト種フレームワーク領域」なる用語は、各々存在する鎖においてヒト免疫グロブリン中のものと等しい少なくとも約70またはそれ以上のアミノ酸を含んで成るフレームワーク領域である。

本明細書中で使用する「ヒト種免疫グロブリン」なる用語は、ヒト種フレームワーク領域を含んで成る免疫グロブリン

についてを及し、この場合、存在する任意の定常領域がヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に相同であり、即ち少なくとも約85～90%、好みしくは約95%が同一である。よって、おそらくCDRを除くヒト種免疫グロブリンの全ての部分が、1または複数の生来のヒト免疫グロブリン配列の対応部分と実質的に相同である。例えば、ヒト種免疫グロブリンはマウス可変領域/ヒト正常領域キメラ抗体を包含しないだろう。

本発明の別の一般的観点によれば、ヒト化された免疫グロブリン鎖を含んで成る抗体の親和力を増加させるために、ヒト鎖またはヒト化免疫グロブリン鎖のフレームワーク中の確定された数のアミノ酸が受容体1gよりもむしろ供与体1g中のそれらの位置のアミノ酸と同じであるように選択される基準も含まれる。

本発明のこの観点は、(例としてCDRの入手源としてマウス抗体を使って)ヒト化抗体を生産する従来方法における親和力の低下の2つの原因が、下記のためであるというモデルに基づく:

(1) マウスCDRをヒトフレームワークと結合する時、CDRに密接したフレームワーク中のアミノ酸がマウスの代わりにヒトになる。理論に及び付けようとせず、本発明者は、それらの変更されたアミノ酸が供与体はマウス抗体中とは異なる静電的または疎水的力を生じるため、それらがわずかにCDRを歪め、そして歪められたCDRは長与抗体中のCDRが行うのと同じくらい効率的な抗原との接觸を行うことができないと考える;

(2) また、CDRに密接しているがその一部ではない（四つまだフレームワークの一部である）元のマウス抗体中のアミノ酸は、親和力の裏面である抗原との接触を行うことができる。全てのフレームワークアミノ酸がヒトにされるので、抗体がヒト化される時にそれらのアミノ酸は失われる。

それらの問題を回避するため、および所望の抗原に対し非常に強力な親和力を有するヒト化抗体を生成するために、本発明はヒト化免疫グロブリンを設計するのに次の4つの基準を使用する。それらの基準を満たさなければ必要な時は組み合わせて使用し、所望の親和力または他の性質を獲得することができる。

基準I：受容体として、ヒト化しようとする供与体免疫グロブリンに非常に相向である特定のヒト免疫グロブリンからのフレームワークを使用するか、または多数のヒト抗体からの中のフレームワークを使用すること。例えば、データバンク（例えばNational Biomedical Research Foundation Protein Identification Resource）中のヒト蛋白質（酵母）可変領域に対するマウス蛋白質（酵母）可変領域の配列の比較は、異なるヒト蛋白質に対する相容性の程度が典型的には約40%から約60-70%まで大幅に異なることを示す。受容体免疫グロブリンとして、供与体免疫グロブリンの重鎖（それぞれ軽鎖）に最も相向であるヒト蛋白質（それぞれ酵母）の1つを選択することにより、供与体免疫グロブリンから受容体免疫グロブリンに移る際にはほとんどアミノ酸が変化しないであろう。よって、ヒト化免疫グロブリン鎖を含んで成るヒト化抗体の正

確な全形態が供与抗体の形態と非常によく似ており、CDRを含む見込みを補らすことができる。

典型的には、重鎖フレームワークを提供するために、少なくとも約10-20の別個のヒト重鎖の代表的コレクションの中の3-5の最も相向な重鎖可変領域配列のうちの1つが受容体として選択され、経由についても同様にして選択されるだろう。好ましくは、1-3の最も相向な領域のうちの1つが使用されるだろう。選択された受容体免疫グロブリン鎖は、供与体免疫グロブリンに対してフレームワーク領域内が最も好ましくは少なくとも約65%の相容性を有するだろう。

いかにして受容体免疫グロブリンを選択するかにかかわらず、受容体よりもむしろ供与体中のそれらの位置のアミノ酸と同じになるようにヒト化免疫グロブリン鎖のフレームワーク中の少数のアミノ酸を選択することによって、より高い親和力を獲得することができる。好ましくは、それらの基準の1つを満足するはとんどまたは全てのアミノ酸位置において、供与体アミノ酸が実際に選択されるだろう。

基準II：ヒト受容体免疫グロブリンのフレームワーク中のアミノ酸が、普通でない（即ち「まれである」：不明細書中で使用されるこの用語は、代表的なデータバンク中のヒト蛋白質（それぞれ酵母）V領域配列のたった約10%しかその位置に存在しないアミノ酸を示す）場合、またはその位置の供与体アミノ酸がヒト配列に典型的である（即ち「普通である」：不明細書中で使用されるこの用語は、代表的なデータバンク中の少なくとも約25%の配列に存在するアミノ酸を示す）場

合、受容体よりもむしろ供与体アミノ酸が選択されるだろう。この基準は、ヒトフレームワーク中の普通でないアミノ酸が抗体構造を破壊しないことを保証するのに役立つ。更に、普通でないアミノ酸をまたまヒト抗体に典型的である供与抗体からのアミノ酸で置換することにより、ヒト化抗体を低免疫原性にすることができる。

基準III：ヒト化免疫グロブリン鎖中の3つのCDRのすぐ近くの位置において、受容体アミノ酸よりもむしろ供与体アミノ酸が選択されるだろう。それらのアミノ酸は、おそらく特にCDR中のアミノ酸と相互作用し、もし受容体から選択されれば供与体CDRを破壊しそして親和力を低下させるであろう。更に、近傍のアミノ酸は抗原と直接相互作用し（Aeilら、*Science*, 233: 747-753 (1986)、これは参考として不明細書中に組み込まれる）、供与体からそれらのアミノ酸を選択することは元の抗体における親和力を提供する全ての抗原接觸を維持するのに望ましいかもしれない。

基準IV：典型的には元の供与抗体の3次元モデルは、CDRの外側の幾つかのアミノ酸がCDRに密接しておりそして水素結合、ファンデルワールス力、疏水的相互作用等によりCDR中のアミノ酸と相互作用する相当な確率を有することを示す。それらのアミノ酸位置では、受容体免疫グロブリンアミノ酸よりもむしろ供与体アミノ酸が選択される。この基準に従ったアミノ酸は、通常はCDR中の成る部位の約3人単位内に側鎖原子を有し、そして分離された化学的力、例えば上記に列挙した力によってCDR原子と相互作用すること

ができるような原子を含まなければならない。抗体などのタンパク質のモデルを作成するためのコンピュータープログラムが一般に利用可能であり、そして当業者に周知である [Loewら、*Int. J. Quant. Chem., Quant. Biol. Symp.*, 15: 55-66 (1988); Brucoceleriら、*Science*, 233: 755-758 (1986) を参照のこと。これら全てが参考として不明細書中に組み込まれる）。それらは本発明の部分を構成しない。実験、全ての抗体が類似の構造を有するので、Brookhaven Protein Data Bankから入手可能な既知の抗体を必要であれば別の抗体の元モデルとして利用することができる。商業的に入手可能であるコンピュータープログラムを用いてコンピューター画面にそれらのモデルを表示し、原子間の距離を算出し、そして様々なアミノ酸相互作用の可能性を評価することができる。

ヒト化またはヒト様抗体は、ヒト疾患において使用されるマウス抗体または攻撃場合にはキメラ抗体を上回る少なくとも3つの潜在的利点を有する：

1) エフェクター効果がヒトであるため、ヒト免疫系のその他の部分と良好に反応することができる（例えば、抗体依存性細胞障害作用 (CDC) または抗体依存性細胞障害作用 (ADCC) により、より効果的に標的細胞を破壊する）。

2) ヒト免疫系は外来物としてヒト化抗体のフレームワークまたは定常細胞を認識しないであろう。従ってそのような在入抗体に対する抗体活性は全体的に外因のマウス抗体または部分的に外因のキメラ抗体に対するよりも小さいであろう。

3) 在入されたマウス抗体は、通常の抗体の半壽期よりも

長尾のフレームワーク領域が、上記に示すに記載されたエヌクレオチドの組合せのうちのいずれかに含まれる。

1つの観点において、本発明は、所望のエピトープ、例えばヒトIL-2レセプター上のエピトープ、に結合することができる免疫グロブリン（例えば抗-Tacモノクローナル抗体）からの重鎖および/または軽鎖CDR（典型的には上述したような別のアミノ酸残基を有する）をコードする組合せDNAセグメントに向かわれる。それらの領域をコードするDNAセグメントは、典型的にはヒト様フレームワーク領域をコードするDNAセグメントに結合されるだろう。例えば、発現時に抗-Tac重鎖および軽鎖可変領域（ヒト様フレームワーク領域と共に）を含んで成るポリペプチド鎖をコードする好ましいDNA配列がそれぞれ図3と図4に示されている。コドン密度および重要でないアミノ酸残基のため、後述するようにそれらの配列の代わりに他の配列を容易に用いることができる。

前記DNAセグメントは、典型的には、ヒト様抗体のコード配列に作用可能に連結した発現調節DNA配列、例えば天然由来のまたは異種のプロモーター領域、を更に含むだろう。好ましくは免疫調節配列は、真核生物宿主細胞を免疫伝染またはトランスフェクションせしめることができるベクター中の真核生物プロモーター系であろうが、原核生物宿主用の調節配列を用いることができる。ベクターが適当な宿主中に組み込まれれば、宿主はスクレオチド配列の高レベル発現に適当な条件下で維持され、そして所望する時、軽鎖、重鎖、既

ずっと短いヒト様三中の半胱氨酸を有することが報告されている [D. Saitoら、*J. Immunol.*, 138: 4534-4538 (1987)]。注入されたヒト化抗体は、おそらく天然のヒト抗体により短縮した半胱氨酸を有し、より少量または少程度の肩量を与えることを可能にするだろう。

本発明は、EPA公報No 0239400に記載されたものに防して改修されたヒト化免疫グロブリン（例えば、ヒトIL-2レセプターに結合することができる）に特に向けられる。その出願明細書（その開示は本発明の範囲から除外される）は、成る種の免疫グロブリンについて、受容体抗体の軽鎖または重鎖可変領域中のCDR領域を異なる種異性の抗体からのCDRの類似部分（典型的には溶媒の影響を受けやすい部分）で置換することを記載している。また、その出願明細書は、成る種の免疫グロブリンについて、抗体結合部位から（結構に）影響されやすい残基を専門に移動する可能箇を記載しており、この残基は明らかに数つかのフレームワーク領域を含むことができる（特に、Aitaiら、*Science*, 233: 747-753 (1986)に記載されたような抗原結合に関与することが既知である残基、またはおそらく接觸相互作用に必須である残基—ただし、それらの選択については該出願明細書において不十分な指針しか与えられていない）。例えば、本発明の好ましい壁紙は、全CDRアミノ酸およびCDRの1つ（または好ましくは各々）のすぐ近くのフレームワークアミノ酸を置換することを伴う。一般に、例えばコンホメーション（および普通はそれらの抗原結合特異性）を維持するためにCDRと連絡をとる

鎖／重鎖二量体もしくは完全な抗体、結合性断片または他の免疫グロブリン形態の取得および精製を行うことができる。

ヒト抗体DNA配列は、既知の方法によって、個々のヒト細胞から、好ましくは不死化されたB細胞から導き取ることができます（Kabat、前掲およびNP 87/02571を参照のこと）。例えば、ヒト×免疫グロブリン定常およびJ鎖遺伝子および配列はHeiterら、*Cell* 22: 197-207 (1980)中に記載されており、そしてヒト免疫グロブリンC_μ遺伝子のヌクレオチド配列はEllisonら、*Nucl. Acid Res.* 10: 4071 (1982)中に記載されている（その両者は参考として本明細書中に組み込まれる）。本発明の免疫グロブリンを作製するためのCDRは、所望の抗原（例えばヒトIL-2レセプター）に結合することができるモノクローナル抗体から同様にして導導され、そしてマウス、ラット、ウサギまたは抗体を生産することができる他の脊椎動物を含む任意の便利な哺乳動物起源において生産されるだろう。DNA配列の適当な起承細胞並びに免疫グロブリンの発現および分泌のための宿主細胞は、多数の入手源、例えばアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから入手することができる（"Catalogue of Cell Lines and Hybridomas", 第5版 (1985) Rockville, Maryland, U.S.A.; これは参考として本明細書中に組み込まれる）。

本明細書中に特定的に記載のヒト様免疫グロブリンに加えて、他の「実質的に相同的」免疫グロブリシを容易に設計することができ、そして当業者に周知の種々な組合せDNA

へ技術を使って製造することができる。例えば、IL-2レセプター免疫グロブリンについては、フレームワーク領域は数かのアミノ酸置換、末端および中間の付加および削除等により一次構造レベルで図3および図4の配列と異なることができる。更に、本発明のヒト様免疫グロブリンを基とし、個々の異なるヒトフレームワーク領域を单独でまた組合せて用いることができる。一般に、遺伝子の修饰は種々の周知の技術、例えば部位特異的突然変異誘発（GillemanおよびSmith、*Gene* 8: 81-97 (1979) 並びにRobertsら、*Nature* 323: 731-734 (1987)を参照のこと；この両者は参考として本明細書中に組み込まれる）により容易に達成することができる。あるいは、一次抗体構造の一品目のみを含んで成るポリペプチド断片を製造することができ、この断片は1または複数の免疫グロブリン活性（例えば抗体結合活性）を有する。また多数の遺伝子と同様、免疫グロブリン誘導遺伝子は、各々が1または複数の別個の生物活性を有する個々の機能性領域を含むため、該遺伝子を別の遺伝子からの新たな性領域（例えば酵母：1987年12月15日提出の一般保護されたU.S.S.N. 132,387を参照のこと。これは参考として本明細書中に組み込まれる）と融合させ、新規性質を有する融合タンパク質（例えば免疫毒素）を製造することができる。

最終的に所望のヒト様抗体を発現することができる本発明の核酸配列は、種々な異なるポリヌクレオチド（ゲノムDNAまたはcDNA、RNA、合成オリゴヌクレオチド等）および区分（例えばV、J、DおよびC領域）から、そして種々な其

なる技術により、発現せしめらごとができる。適当なゲノム配列を連結することが現在最も一般的な製造方法であるが、cDNA配列を使用してもよい(ヨーロッパ特許公報No.62239400およびleichsen,L.ら、Nature 322: 323-327 (1987)を参照のこと。この両者は参考として本明細書中に組み込まれる)。

前に述べたように、該DNA配列を発現調節配列に作用可能に連結した(即ち、酵母を保有するように配置させた)上で該配列が宿主内で発現されるだろう。それらの発現ベクターは、典型的にはエピソームとしてまたは宿主染色体DNAの組み込み部分として宿主内で複製可能である。一般に、発現ベクターは、所望のDNA配列により形質転換された細胞の検出を可能にするために選択マーカー、例えばテトラサイクリンまたはネオマイシン耐性遺伝子を含むだろう(例えば、米国特許第4,704,362号を参照のこと;これは参考として本明細書中に組み込まれる)。

大腸菌(E. coli)は本発明のDNA配列をクローニングするのに特に有用な原核生物宿主である。使用に適当な他の微生物宿主としては、バシラス属、例えばバシラス・テブチリス(Bacillus subtilis)、並びに他の膜内細胞、例えばサルモネラ属(Salmonella)、セラチア属(Serratia)および色々のショードモナス属(Pseudomonas)種が挙げられる。これらの原核生物宿主では、典型的には宿主細胞と適合性である発現調節配列(例えば複製開始点)を含むであろう発現ベクターを作製することもできる。加えて、任意の数の種々の周知のプロモーター、例えばラクトースプロモーター系、ト

リブトファン(:lpp)プロモーター系、ターラクターマーゼプロモーター系、またはメタージからプロモーター系が存在するだろう。プロモーターは、典型的には所望によりオペレーター配列と共に発現を調節し、そして転写および翻訳を開始および終了させるためのリボソーム結合部位等を有するだろう。

他の微生物、例えば酵母を発現に用いることもできる。サッカロミセス(Saccharomyces)は好みしい宿主であり、適当なベクターは、発現調節配列、例えば3-ホスキグリセレートキナーゼおよび他の解糖酵素プロモーターを包含するプロモーター、並びに所望により複製開始点、終結配列等を有する。

動物に加えて、哺乳動物細胞細胞培養物を用いて本発明のポリペプチドを発現および生産せしめらることもできる(Winnacker, "From Cells to Clones", VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987)を参照のこと;これは参考として本明細書中に組み込まれる)。完全な免疫グロブリンを分泌することができる多数の適当な宿主細胞系が技術の現状において開発されているため実際は真核細胞が好みしい。そのような真核細胞としては、CHO細胞系、様々なCOS細胞系、HeLa細胞、ミニローマ細胞系等が挙げられるが、好ましくは形質に換されたB細胞またはハイブリドーフである。それらの選択のための発現ベクターは、発現調節配列、例えば複製開始点、プロモーター、エンハンサー(Queen,C.ら、Immunol. Rev. 89: 49-68 (1985);これは参考として本明細書中に組み込まれ

る)、および必要なプロセシング情報部位、例えばリボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位、および転写ターミネーター配列を含むことができる。好みしい発現調節配列は、エンハンサーを有するSV40(MulliganおよびBerg、Science 209: 1422-1427 (1980)を参照のこと)、免疫グロブリン遺伝子、アデノウイルス、ウシ乳頭腫ウイルス等に由来するプロモーターである。

若目のDNAセグメント(例えば、重鎖および軽鎖コード配列及び発現調節配列)を含むベクターは、宿主細胞のタイプに依存して異なる周知の方針により、宿主細胞中に移すことができる。例えば、原核細胞には塩化カルシウムトランスフェクション法が常用され、一方他の細胞宿主にはリン酸カルシウム処理またはエレクトロポレーションが使用される(一般には、Maniatisら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1982)を参照のこと;これは参考として本明細書中に組み込まれる)。

一回発現されれば、本発明の完全抗体、それらの二量体、個々の軽鎖および重鎖、または他の免疫グロブリン形態を当該界の標準とし、例えば蚕豆アンモニウム沈殿、アフィニティカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動等によって精製することができる(一般的には、Scopes,R.、Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y. (1982)を参照のこと)。少なくとも約90-95%純度の実質的に純粋な免疫グロブリンが好みしく、98-99%またはそれ以上の純度が医療用途に好みしい。部分的にまたは所望の時に均質まで精製

されれば、蛋白質的(体外的を含む)またはアセイ方法、免疫蛍光染色法等を開発しそして実施する際に試ポリペプチドを使用することができる(一般的には、Immunological Methods, 第1および2巻、LefkowitzおよびPetraitis編、Academic Press, New York, N.Y. (1979および1981)を参照のこと)。

本発明において例示されるIL-2レセプター特異抗体は、典型的にはT細胞介在性の病気状態を処置することにおいて個々に用いられるだろう。通常、病気に関連する細胞がIL-2レセプターを有すると同定された場合、ヒトIL-2レセプターへのIL-2の結合を阻止することができるヒト様抗体が適当である("Treating Human Malignancies and Disorders"と題するU.S.S.N.085,707を参照のこと;これは参考として本明細書中に組み込まれる)。例えば、急速に進む典型的な病気状態として、臓器移植、例えば心臓、肺、腎臓、肝臓等の移植を行う患者における移植拒絶反応および対宿主性移植片病が挙げられる。他の病気としては、自己免疫疾患、例えば1型糖尿病、多発性硬化症、関節リウマチ、全身性紅斑狼瘡および重症筋無力症が挙げられる。

本発明のヒト様抗体は、別の抗体、特に病気の一因となる細胞上の別のマーカーと反応するヒトモノクローナル抗体と組合せて使用することもできる。例えば、適当なT細胞マーカーとしては、第一回国際白血球分化ワークショップ(First International Leukocyte Differentiation Workshop), Leukocyte Typing, Bernardら編、Springer-Verlag, N.Y.

(1984) (これは参考として本明細書中に組み込まれる)により名されたいわゆる「分化のクラスター (Clusters of Differentiation)」中に分類されるものを挙げることができる。

抗体は、化学療法または免疫抑制と共に与えられる割合に投与される組成物として使用することができる。典型的には、そのような薬剤としては、シクロスボリンAまたはブリン類似体（例えばメトトレキセート、6-メルカプトブリノン等）が挙げられるだろうが、当業者に周知である多数の他の薬剤（例えばシクロホスファミド、ブレドニゾン等）も使用することができる。

本発明の特徴的な医薬組成物は、免疫療法における当該抗体の使用を含んで成る。免疫療法は2つの成分により特徴づけられ、そしては臓器内または生体内において選択細胞を殺すのに特に有用である。第一成分は、付着または吸収すると細胞に対して通常は致命的である細胞毒性物質である。「デリバリー試験剤」として知られる第二成分は、活性物質を特定の細胞タイプ、例えばガンを含む細胞に供給するための手段を提供する。この2成分は通常は様々な周知の化学的方法のいずれかによって一緒に化学的に結合される。例えば、細胞毒性物質がタンパク質でありそして第二成分が完全な免疫グロブリンである時、結合は異種二価性架橋用、例えばSPDP、カルボジイミド、グルタルアルdehyド等によることができる。日々の免疫療法の製造が当業界で周知であり、例えば“Monoclonal Antibody-Toxin Conjugates: Aiding the Magic Bul-

let, Thorpeら、Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine, Academic Press, 158-199 (1982) 中に見つけることができる。これは参考として本明細書中に組み込まれる。

様々な細胞毒性物質が免疫療法における使用に適当である。細胞毒性物質としては、放射性核種、例えばヨウ素-131、イットリウム-90、レニウム-188 およびビスマス-212；多量の化学療法剤、例えばビンデシン、メトトレキセート、アドリアマイシンおよびシスプラチニン；並びに同細胞毒タンパク質、例えば、リボソーム阻害タンパク質アメリカナマゴボウ抗ウイルスタンパク質、シュードモナス外毒素A、リシン、ジフェリヤ毒素、リシンA類等；または細胞表面活性な物質、例えばホスホリバーゼ酵素（例えばホスホリバーゼC）を挙げることができる。（1988年12月23日に提出された一般現状されたU.S.S. 3,07/290,962; “Chimeric Toxins”, DiseasesおよびPharmac. Ther., 25: 355-381 (1982)；並びに“Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy”, BaldwinおよびByers 著、159-173, 224-266頁、Academic Press (1985) を参照のこと。これら全てが参考として本明細書中に組み込まれる。】

免疫療法のデリバリー成分は、本発明のヒト母免疫グロブリンを含むだろう。好みしくは完全な免疫グロブリンまたはそれらの結合性断片、例えばFabが使用される。典型的には、免疫療法中の抗体はヒト IgMまたはIgG イソタイプのものであるだろう。しかし所望の時には他の哺乳動物正常領域を用いることもできる。

本明細書中に組み込まれる。

本発明の抗体は肝臓のために施設乾燥することができ、そして使用前に適当な液体中で再構成することができる。この技術は從来の免疫グロブリンに関して効果的であることが示されており、当交界で既知の施設乾燥および再構成技術を用いることができる。施設乾燥と再構成は様々な程度の抗体活性の低下をもたらし得ること（例えば從来の免疫グロブリンでは、IgM抗体は IgG抗体よりも大きな活性低下を有する傾向がある）、そして使用レベルを調整して埋め合わせなければならないことがあることは、当業者により明白であろう。

本発明のヒト母抗体はまたはその混合物を含むする組成物は、予防および/または治療用途のために投与することができる。治療用途においては、組成物は、既に病気にかかっている患者に、病気を治癒するかまたは少なくとも部分的に緩和するのに十分な量で投与される。これを説明するのに適切な語は「治療的有効量」と定義される。この用途に有効な量は、感染の程度および患者自身の免疫系の一般状態に依存するであろう。しかし通常は、用量あたり約1-約200mgの抗体、より好みしくは重量あたり5-25mgの用量が使用されるだろう。本発明の材料は通常は深刻な病気状態、即ち今にかかるかまたはもしかすると今にかかる状況において使用されるだろうことを全員に因かなければならぬ。そのような場合、本発明のヒト母抗体により達成される外来物質の最小化および「外来物質」拒絶の低減率の点からみて、実質的治療量の抗体を投与することが可能でありそして治療量に

本発明のヒト様抗体およびその医薬組成物は、特に鼻腔口、即ち皮下、筋肉内または静脈内投与に有用である。静脈内投与用組成物は、通常、許容される扭体、好みしくは水性扭体中に溶解された抗体の粉砕または混合物を含んで成るだろう。様々な水性扭体、例えば水、炭酸化された水、0.4%食塩水、0.3%グリシン等を使用することができる。それらの扭体に無用であり、通常は粗状物質を含まない。それらの組成物は、常用される周知の滅菌技術により滅菌することができる。該組成物は、適切な生理的条件に必要である時は医薬上許容される精製物質、例えば防腐剤および緩衝剤、活性酸素剤等、例えば酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウム等を含有することができる。それらの組成物中の抗体の濃度は広範囲に亘り異なることができ、即ち、少なくとも約0.5%未満から、通常は少なくとも約1%から、15-20重量%ほどまでに及ぶことができ、そして扭体の体積、粘度等に主として基づいて、選択された特定の投与形式に沿って選択されるだろう。

筋肉内注射用の典型的医薬組成物は、1mlの無菌試験管と50mgの抗体を含むように調製することができる。静脈点滴注入用の典型的医薬組成物は、250mlの無菌リンガーボトルと150mgの抗体を含むように調製することができる。静脈内投与可能な組成物の実際の製造方法は当業者に周知であるかまたは明白であり、そして例えばRemington's Pharmaceutical Science, 第15版、Hawthorne Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1980) 中に詳細に記述されており、これは参考として

より望ましいと感じられるかもしれない。

予防用法においては、本発明の抗体またはその結合物を含有する組成物は、患者の抵抗性を高めるためにまだ病気状態でない患者に投与される。そのような量は「予防的有効量」として定義される。この用途の場合、正常な量は患者の健常状態および免疫の一般レベルに依存するが、通常は用量あたり0.1～25mg、特に患者あたり0.5～2.5mgであろう。好ましい予防用法には、腎臓移植拒絶の防止である。

本発明のヒト抗体は、更に試験管内において広範な用途を見出しができる。一例として、T細胞の型決定、特異的IL-2レセプターを有する細胞または該レセプターの断片の単離、ワクチンの調製等に特異的な抗体を利用することができます。

診断目的に、抗体を標識してもよくまたは未標識であってもよい。未標識抗体は、ヒト抗体と反応性である別の標識抗体（二次抗体）、例えばヒト免疫グロブリン正常領域に特異的な抗体と組合せて使用することができます。あるいは抗体を直接標識してもよい。様々な標識、例えば放射性核種、並光团、酵素、酵素基質、免疫捕獲因子、酵素阻害剤、リガンド（特にハプテン）、等を使用することができる。多数の型式のイムノアッセイが利用可能であり、そして当業者に周知である。

細胞活性に対する保護もしくは検出または活性された抗原の存在の検出において問題の抗体を使用するためにキットを供給することもできる。本発明の問題の抗体組成物は、单独

または试管の底地タイプに特異的な追加の抗体と共に、各過は1つの容器に実験室形態で提供することができる。抗体は標識もしくは未標識と組合されていても示標合であってもよく、最強度、例えばTris、リン酸塩、硫酸等の緩衝液、安定剤、殺菌剤、不活性タンパク質、例えば血清アルブミン等、および使用技術者のセッティングと共にキット中に含まれる。一般にこれらの材料は活性抗体の量を基にして約5重量%を構成し、通常は抗体濃度を基にして少なくとも約0.001重量%の合計量において存在するだろう。しばしば、活性成分を希釈するための不活性増量剤または緩衝液を含めることが望ましく、この場合緩衝液は全組成の約1～99重量%で存在することができる。キメラ抗体を結合することができる二次抗体をアッセイにおいて使用することができ、これは通常は別の容器中に存在するだろう。二次抗体は典型的には標識と組合され、上述の抗体製剤と同様にして製造化される。

次の実施例は例示の目的で与えられ、限定的ためではない。

実験

ヒト標的物および重複抗体の設計

ヒト化抗体のフレームワークを提供するためにヒト抗体Euの配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest, Kabat, E.ら, U.S. Dept. of Health and Human Services, 1983)を使用した。というのは、抗-Tacの重複のアミノ酸配列がNational Biomedical Foundation Protein Identification Resource中の他のいずれの蛋白配列よりもこの抗体

の重複に相同意が高かったためである。

ヒト化重複の配列を選択するために、抗-Tac 重複配列（一般標識されたU.S.S.N.の 186,862と223,037を参照のこと。これらは参考として本明細書中に記載される）をEu重複配列と整列した（図1）。各位置において、その位置が次のカテゴリーのいずれか1つに入らない限り、Euアミノ酸をヒト化配列のために選択した。次のカテゴリーのいずれか1つに入る場合、抗-Tac アミノ酸を選択した。

(1) その位置が、Kabatら、前掲により定義されたような初捕獲決定領域(CDR)中にある (アミノ酸31～35, 50～66, 99～105) :

(2) その位置ではEuアミノ酸がヒト重複配列にまれであり、一方抗-Tac アミノ酸がその位置でヒト重複配列に典型的であった (アミノ酸27, 93, 95, 98, 107～109, 111) :

(3) その位置が抗-Tac 重複のアミノ酸配列中のCDRのすぐ近くであった (アミノ酸30と67) :

(4) 抗-Tac 抗体の3次元モデルが、該アミノ酸が抗原結合部位に物理的に密接していることを示唆した (アミノ酸43と68) 。

数つかのアミノ酸はこれらのカテゴリーのうちの複数に入るが、それらは1つのカテゴリーにのみ挙げてある。

ヒト化重複の配列を選択するために、抗-Tac 重複配列をEu重複の配列と整列させた（図2）。その位置が同じくカテゴリー(1)～(4)のうちの1つに入らない限り、Euアミノ酸を各位置において選択した（カテゴリー定義中の重複を除く）。

如を枚数で置き換える) :

- (1) CDR (アミノ酸24～34, 50～55, 89～97) 。
- (2) Euよりも抗-Tac アミノ酸がより典型的である (アミノ酸48と63) 。
- (3) CDRに近い (アミノ酸なし; Euと抗-Tac はそれらの位置全てにおいて互に同じであった) 。
- (4) 結合領域に3次元的に近接している可能性 (アミノ酸60) 。

重複（図3）と軽鎖（図4）の実際のスクレオチド配列は次のようにして選択した。

- (1) 軽スクリオチド配列は上述のようにして選択したアミノ酸配列をコードする。
- (2) それらのコード配列の5'側のスクレオチド配列はリーダー（シゲナル）配列、即ち KOPC 53抗体の軽鎖のリーダーおよびPCH 108A抗体の重鎖のリーダー（Kabatら、前掲）をコードする。それらのリーダー配列を抗体の典型として選択した。
- (3) コード配列の3'側のスクレオチド配列は、抗-Tac 配列の一部分であるマウス軽鎖J 5セグメントおよびマウス重鎖J 5セグメントに従う配列である。それらの配列はスプライス供給配列を含むために含まれる。
- (4) 配列の各末端には、Iba 1部位での切断およびペクターの Iba 1部位へのクローニングを可能にするための Iba 1部位が存在する。

ヒト化軽鎖および重鎖両分子の作製

重鎖を合成するために、Applied Biosystems 380B DNA 合成装置を使って4つのオリゴスクレオチド HES12, HES13, HES14, HES15 (図 5 A) を合成した。それらのオリゴスクレオチドの2つは、軽鎖の各端の一端であり、そして各オリゴスクレオチドはアニーリングを可能にするために約20ヌクレオチドが次のスクレオチドとオーバーラップしている (図 5 B)。該オリゴスクレオチドは一端にすると、*Xba*I 部位での切断を可能にするために各末端にはつかの余分なスクレオチドを有する完全なヒト化軽鎖をカバーする。該オリゴスクレオチドをボリアクリルアミドゲルから精製した。

各オリゴスクレオチドを、標準手順 (*Mus musculus*、前膵を参照のこと) により ATP と T4 ポリスクリオチドキナーゼを使ってリン酸化した。リン酸化したオリゴスクレオチドをアニーリングするために、それらを各々約 3.75 μl の温度において 40 μM の TA (33 mM Tris 酸性、pH 7.9, 66 mM 酸カリウム、10 mM 酸マグネシウム) 中に混ぜし、4 分間 95°C に加热し、そして 4°C にゆっくり冷却した。各オリゴスクレオチドの反対端を合成することにより該オリゴスクレオチドから完全な遺伝子を合成するために (図 5 C)、次の成分を 100 μl の最終容積において添加した：

10 μl アニールしたオリゴスクレオチド
各 0.16 μM デオキシリボスクレオチド
0.5 mM ATP
0.5 mM DTT

スクレオチドをボリアクリルアミドゲルから精製した。

軽鎖遺伝子はこれらのオリゴスクレオチドから2部分において合成した。JF01 と JF02 及び 0.5 μl を 20 μl のシークエナーゼ試験管 (40 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM 酸化マグネシウム、50 mM 酸化ナトリウム) 中に混合し、70°C に 3 分間加熱し、そして該オリゴスクレオチドをアニーリングさせるためにゆっくりと 23°C まで冷却した。JF03 と JF04 も同様にして処理した。各反応液を DTT 10 mM および各デオキシリボスクレオチド 0.5 μM にし、6.5 μl のシークエナーゼ (US Biochemicals) を最終容積 24 μl において添加し、そして 37°C で 1 時間インキュベートして該スクレオチドの反応方向を合致した。各反応液に *Xba*I と *K Hind* III を添加して DNA を消化した (JF02 と JF03 がオーバーラップする領域の中、従って合成された DNA の各々の中に *K Hind* III 脱離位が存在する: 図 6 B)。反応液をボリアクリルアミドゲル上で泳動し、*Xba*I - *K Hind* III 断片を精製し、そして標準法により pUC18 中にクローニングした。各断片について数種のプラスミド単離物をジデオキシ法により配列決定し、そして正しいものを選択した。

ヒト化軽鎖および重鎖を発現させるためのプラスミドの作製

軽鎖 *Xba*I 断片が導入されている pUC19 プラスミドから該断片を抽出し、そして該断片により正しい方向においてベクター pY71 (一般に記載された U.S. S. N. 223,037 を参照のこと) の *Xba*I 部位に導入し、プラスミド pHuGTAC1 (図 7) を作製した。このプラスミドは、適当な宿主細胞中にトランスフェクトすると高レベルの発現を発現するだろう。

100 μl / ml	BSA
3.5 μl / ml	T4 g43タンパク質 (DNA ポリメラーゼ)
25 μl / ml	T4 g44/62タンパク質 (ポリメラーゼ補助タンパク質)
25 μl / ml	45タンパク質 (ポリメラーゼ補助タンパク質)

この混合物を 37°C で 30 分間インキュベートした。次いで 10 μl の T4 DNA ガーゼを添加し、そして 37°C で 30 分間インキュベートした。70°C で 15 分間反応液をインキュベートすることにより、ポリメラーゼとりガーゼを不活性化した。遺伝子を *Xba*I で消化するために、反応液に 200 μl / ml の BSA と 1 mM の DTT を含む 50 μl の 2 × TA, 43 μl の水、および 5 μl の 50 μl の *Xba*I を添加した。反応液を 37°C で 3 時間インキュベートし、そしてゲル上で泳動した。ゲルから 43 kbp の *Xba*I 断片を精製し、そして標準法によりプラスミド pUC19 の *Xba*I 部位中にクローニングした。4 つのプラスミド単離物を精製し、ジデオキシ法を使って配列決定した。そのうちの 1 つが正しい配列を有した (図 3)。

軽鎖を合成するために、4 つのオリゴスクレオチド JF01, JF02, JF03, JF04 (図 6 A) を合成した。それらのオリゴスクレオチドの2つは、軽鎖の各端の一端であり、そして各オリゴスクレオチドはアニーリングを可能にするために約 20 ヌクレオチドが次のスクレオチドとオーバーラップしている (図 6 B)。該オリゴスクレオチドは一端にすると、*Xba*I 部位での切断を可能にするために各末端にはつかの余分なスクレオチドを有する完全なヒト化軽鎖をカバーする。該オリ

2 つの軽鎖 *Xba*I - *K Hind* III 断片が導入されている各 pUC18 プラスミドからそれらの断片を単離した。ベクタープラスミド pY71 (一般に記載された U.S. S. N. 223,037 を参照のこと) を *Xba*I で切断し、標準法により脱リン酸化して 2 断片を連結させしめた。所望の反応生成物は次のような形状を有する：ベクター - *Xba*I - 断片 1 - *K Hind* III - 断片 2 - *Xba*I - ベクター。数種のプラスミド単離物を削離マッピングと配列決定により分析し、この形態を有する 1 つのプラスミドを選択した。このプラスミド pHuGTAC (図 8) は完全なヒト化軽鎖 (図 4) を有し、適当な宿主細胞中にトランスフェクトすると高レベルの発現を発現するだろう。

ヒト化抗体の合成および親和力

プラスミド pHuGTAC および pHuGTAC をマウス Sp2/0 細胞中にトランスフェクトし、そして該プラスミドを組み込んだ細胞を、プラスミド上の espI (おおよび *Xba* 遺伝子 (図 7, 8)) により付与されるミコフェノール酸および/またはヒグロサイシン B に対する耐性に基づいて選択法により選択した。それらの細胞が IL-2 レセプターに結合する抗体を分泌したことを見ためるために、細胞からの上清を IL-2 レセプターを発現することが知られている RUT-102 細胞と共にインキュベートした。洗浄後、細胞をフルオレセイン接合ヤギ抗ヒト抗体と共にインキュベートし、洗浄し、そして PACSCAN サイトフルオロメーター上で蛍光について分析した。結果 (図 9 A) は、ヒト化抗体がそれらの細胞には結合するが、IL-2 レセプターを発現しない Jurkat T 細胞には結合しな

い(図9D)ことを明らかに示す。対照として、もとのマウス抗-Tac 抗体を用いてそれらの細胞を染色すると同様な結果を与えた(図9B,C)。

更なる実験のために、ヒト化抗体を生産する細胞をマウスに注入し、そして生じた腫瘍を回収した。抽出液に従って Affigel-10 支持体(Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA) 上に凝製されたナギ抗体免疫グロブリン抗体のアフィニティーカラムに通過させることにより、腫瘍からヒト化抗体を実質上均質まで精製した。もとの抗-Tac 抗体に比較してヒト化抗体の緩和力を評定するために、競合的結合実験を行った。約 5×10^4 個の RUT-102 細胞を豆乳虫(10~40ng)の抗-Tac 抗体とヒト化抗-Tac 抗体と共に4℃で10分間インキュベートした。次いで細胞に 100ng のビオチン化抗-Tac を添加し、そして4℃で30分間インキュベートした。この量の抗-Tac は細胞上の結合部位を飽和するのに十分であり、大過剰であってはならないことが予め決定されている。0.1%アジ化ナトリウムを含む 2mL のリン酸改変緩衝液(PBS)で細胞を2回洗浄した。次いで 250ng のフィコニリトリン結合アビシンと共に細胞を4℃で30分間インキュベートし、この結合アビシンは既に細胞に結合しているビオチン化抗-Tac に結合した。細胞を上記のように再び洗浄し、1%バラホルムアルデヒドを含む PBS 中で固定し、そして FACSCAM オートフルオロメーター上で蛍光分析した。

第一段階における競合体としての抗-Tac 抗体の使用量を増加していくと(10~40ng)、第二段階において細胞に結合

することができたビオチン化抗-Tac の量を減少させ、從って最終段階において結合したフィコニリトリン結合アビシンの量を減少させ、こうして蛍光を減少させた(図10A)。当量(20ng)の抗-Tac および競合体として使ったヒト化抗-Tac は、蛍光をほぼ同じ程度に減少させた(図10B)。このことは、それらの抗体がほぼ同じ緩和力(3~4倍以内)を有することを示す。というのは、もし一万ガラスと大きな緩和力を有するなら、より有効にビオチン化抗-Tac と競合し、従って蛍光をもっと減少させたであろうからである。

ヒト化抗体の生物学的性質

ヒトの病気の処置における最適な使用のため、ヒト化抗体は IL-2 レセプターを発現している体内的 T 細胞を破壊することができるべきである。抗体が標的細胞を破壊し得る一つの機序は、ADCC と呼ばれる抗体依存性細胞障害作用 [Fundamental Immunology, Paul. W. 编, Raven Press, New York (1984), 681頁] であり、この場合抗体に、標的細胞と標的を溶解することができるマクロファージのようなエフェクター細胞との間に橋権を形成する。ヒト化抗体と元のマウス抗-Tac 抗体が ADCC を媒介することができるかどうかを決定するために、經典法によりクロム放出アッセイを行った。詳しくは、IL-2 レセプターを発現するヒト白血病 RUT-102 細胞を ⁵¹Cr と共にインキュベートし、それらにこの放射性標識を吸収させた。次いで RUT-102 細胞を過剰量の抗-Tac またはヒト化抗-Tac 抗体のいずれか一方と共にインキュベートした。次にヒト粗挽え IL-2 との約20時間のインキュ

ベーションによって活性化された通常の精製ヒト末梢血单核細胞である 30:1 または 100:1 の比のエフェクター細胞と共に 4 時間インキュベートした。精製 RUT-102 細胞の放射を示す ⁵¹Cr の放出を測定し、そしてバックグラウンドを差し引いた(表1)。その結果は、どちらの比のエフェクター細胞においても、抗-Tac は有意な数の標的細胞を溶解しなかった(5%未満)が、一方ヒト化抗体は溶解した(20%より多く)ことを示す。従って、ヒト化抗体は、T 細胞白血病または他の T 細胞介在症の疾患を治療することにおいて、おそらく元のマウス抗体よりも効果的であろう。

表 1

ADCC後の ⁵¹Cr 今立出率(%)

抗 体	ニフェクター : 標的比	
	30:1	100:1
抗-Tac	4%	< 1%
ヒト化抗-Tac	24%	23%

上記から、本発明のヒト化免疫グロブリンが他の抗体の多くの利点を提供することは明らかであろう。例えば、抗-Tac マウスモノクローナル抗体と比較すると、本発明のヒト化 IL-2 レセプター免疫グロブリンは、より選択性的に生産することができ、そして実質的に少ない外来アミノ酸配列を含むことができる。ヒト型への注入後に抗原性となる可能性の減少に、上記の基盤に従って設計された免疫グロブリンにとって有意な効率的改善を意味する。

本発明を明確化および理解のために以下および実施例によ

り段分詳細に記載してきたが、添付の請求の範囲内で幾つかの変更および改良を行い得ることは明らかであろう。

	S	G	L	S	S	A	S	A	S	P	S	S	V
1	S	T	S	S	S	A	S	A	S	P	S	S	V
2	S	C	E	A	S	T	F	T	S	R	M	A	V
3	S	C	E	A	S	C	S	S	S	A	I	K	V
4	S	D	S	L	S	V	T	T	H	P	S	T	T
5	S	D	S	L	S	V	T	T	H	V	X	G	H
6	S	O	S	C	A	L	T	A	D	S	S	S	A
7	S	O	S	C	A	L	T	A	D	E	S	T	A
8	<u>S</u>	<u>O</u>	<u>S</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>A</u>
9	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>A</u>
10	<u>M</u>	<u>O</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>F</u>	<u>O</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	<u>R</u>
11	<u>M</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>B</u>	<u>S</u>	<u>O</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>F</u>	<u>C</u>
12	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>Y</u>	<u>F</u>	<u>O</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>G</u>	<u>O</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>V</u>
13	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>S</u>

FIG. 1

	2	V	L	T	O	S	P	A	I	N	S	A	S	P	C	E	Z	T
	3	O	R	T	O	S	P	S	T	L	S	A	S	T	R	E	Z	T
	4	T	G	S	R	S	S	S	I	S	E	H	Y	F	Q	G	X	P
	5	T	G	R	A	S	S	S	I	T	Y	C	A	T	Q	Q	A	P
	6	T	S	P	E	L	V	I	T	S	X	L	A	S	G	T	P	A
	7	X	A	P	E	L	L	V	T	S	A	S	S	E	T	Z	S	A
	8	R	S	S	S	S	S	S	T	S	S	L	I	S	X	E	A	
	9	M	F	C	S	S	S	S	T	S	S	L	I	S	S	L	O	P
	10	E	O	A	A	T	T	T	H	O	S	S	T	P	L	F	S	
	11	D	U	F	A	T	T	T	G	O	T	S	S	X	R	F	G	

FIG. 2

FIG._3.

FIG.—4.

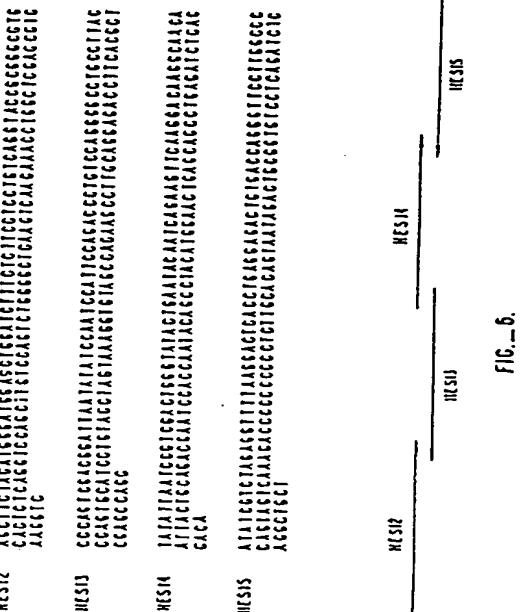


FIG. 6.



Fig. 6.

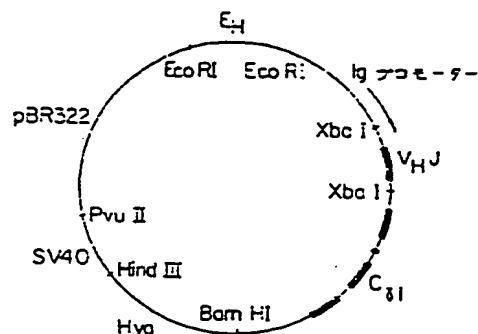


FIGURE 7.

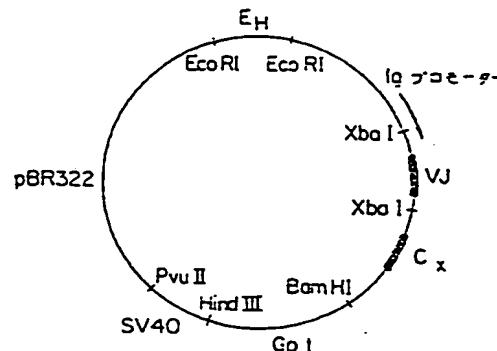


FIG. 8.

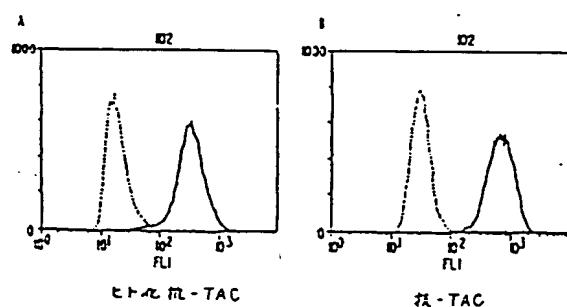


FIG._9.

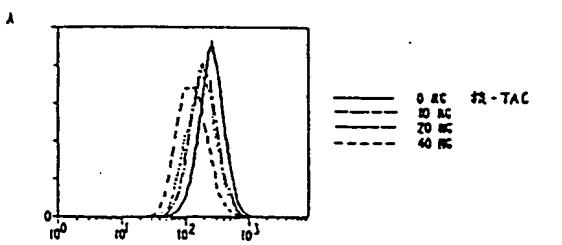


FIG. 10.

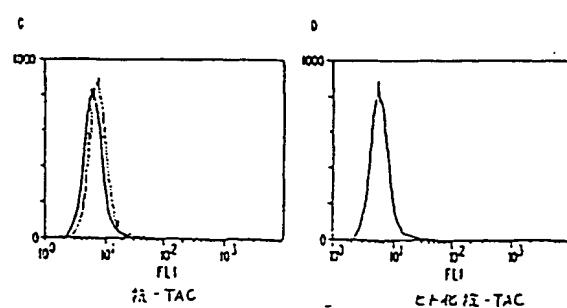


FIG.—9.

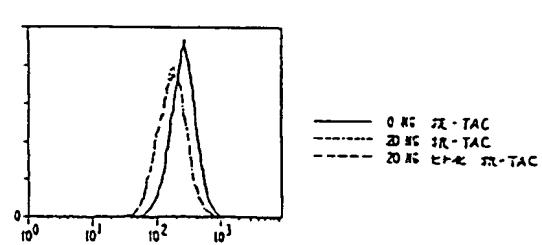


FIG. 10.

PCT/CHN/00017

A. INFORMATION CONCERNING THE SUBJECT DOCUMENT		
REF ID: PCT/CHN/00017 DATE ISSUED: 20 SEPTEMBER 1985 ISSUE NUMBER: 435/85; 435/85.1,172.3; 436/85; 435/85.1		
B. INFORMATION CONCERNING THE ATTACHMENT		
T.P.	LE.A 4,816,547 (GARRELL ET AL) Issued 23 March 1969. See entire document.	1-22
Φ	EP.A 239,400 (VODICKA) Issued 20 September 1985 See entire document.	1-22
Φ	AD.A 437/1783 (RODGER ET AL) Issued 29 March 1985. See entire document.	1-22
Φ	CH.A 2125941 (ZIMMERSTEIN ET AL) Issued 14 October 1987. See entire document.	14-15,14-16
T	Science, Volume 229 Issued 20 November 1985 (VODICKA ET AL) "Understanding natural's tolerance to creutzfeld-teller variants", pp 1046-1047. See entire document.	1-22
(cont'd.)		
C. INFORMATION CONCERNING THE ATTACHMENT		
01 June 1990		02 JUL 1990
IS&US		Mitchell Marks

PCT/CHN/00017

A. INFORMATION CONCERNING THE SUBJECT DOCUMENT		
REF ID: PCT/CHN/00017		
B. INFORMATION CONCERNING THE ATTACHMENT		
See Attachment Sheet, (page 4).		
Φ		
Φ		
Φ		
Φ		
Φ		

PCT/CHN/00017

A. INFORMATION CONCERNING THE SUBJECT DOCUMENT

1. Science, 1985, 239, 1046-1047, refers to a communication of two papers concerning immunological specificities for the immunoprecipitation of tritiated T cell receptors from human lymphocytes, classifiable in Class 320, subsection A1 and under the subclass A2.

2. Science, 1985, 239, 1722-1723, refers to a communication between VODICKA and VODICKA, classifiable in Class 320, subsection A1 and under the subclass A2.

3. Science, 1985, 239, 1334-1335, concerns a communication between VODICKA and VODICKA, classifiable in Class 320, subsection A1.

The communications are grouped according to the units of immunological specificity indicated in Table 12-2. The subsections are: I antigen, made from the entire substance of the isolated receptor;

Antigenic groups III and Group II, are selected as individual immunological specificities or immunological parameters;

Antigenic groups I and Group II, are related as immunological and immunobiological. Also, the products of which may not be made of a immunological nature, unless different from the product of Groups II.

B. INFORMATION CONCERNING THE ATTACHMENT		
REF ID: PCT/CHN/00017		
Y	Science, Volume 229 Issued 20 September 1985 VODICKA "Transformants provide novel chimeric antibodies," pp. 1222-1223. See entire document.	1-22
Φ	Science, Volume 232 Issued 07 May 1986 MALLINCKRODT "The structure, function and expression of inter-leukin-2 receptors on normal and malignant lymphocytes," pp. 727-732. See entire document.	1-17
Φ	Journal of Immunology, Volume 134(4) Issued 15 April 1985 LINDNER "A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human T cells". See entire document.	14-15,14-16
Φ	Science, Volume 239 Issued 23 March 1988 VODICKA ET AL "Recombinant Human antibodies: Purifying an antibodyzyme activity," pp. 1334-1335. See entire document.	1-22
Y	Nature, Volume 331 Issued 29 May 1988 JONES ET AL "Predicting the complementarity-determining regions in a human antibody with clones from a mouse," pp. 322-323. See entire document.	1-17
Φ	Nature, Volume 332 Issued 24 March 1988 ALDRIDGE ET AL "Developing human antibodies for therapy," pp. 323-325. See entire document.	14-15,14-16

第1頁の続き

⑤Int. Cl.³ 地圖記号 片内整理番号
A 61 K 39/395 U 8829-4C
C 07 K 15/06 7731-4H
C 12 N 5/10
15/13
J(C 12 P 21/08
C 12 R 1:91)

優先権主張 ②1989年2月13日③米国(US)④310,252
⑤発明者 セリク, ハロルド エドワイン アメリカ合衆国, カリフォルニア 94002, ベルモント, サニースローブ アベニュー 1673